

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-225781

(43)公開日 平成6年(1994)8月16日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C 1 2 P 17/08

7432-4B

C 0 7 D 309/30

D 9360-4C

// (C 1 2 P 17/08

C 1 2 R 1:84)

(C 1 2 P 17/08

審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平5-150397

(22)出願日

平成5年(1993)6月22日

(31)優先権主張番号

TO 9 2 A 0 0 0 5 3 2

(32)優先日

1992年6月22日

(33)優先権主張国

イタリア(IT)

(71)出願人 591104125

ベルノ・リカルド

PERNOD RICARD

フランス国、75008 パリ、プールヴァー

オースマン 142

(72)発明者

ロザンナ・カルディオ

イタリア、20133ミラノ、ヴィア・ピエト

ロ・ダ・コルトナ7

(72)発明者

クラウディオ・フガンティ

イタリア、20129ミラノ、ヴィア・ジオヴ

ァン・パティスタ・ナザリ8

(74)代理人

弁理士 広瀬 章一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物を用いた飽和デルターラクトンの製造方法

(57)【要約】

【構成】 デルターデカノリドおよび/またはデルタードデカノリドまたはそれらの混合物を、対応する不飽和ラクトンであるデルターデセン-2-オリドまたはデルタードデセン-2-オリド、あるいはそれらの混合物を含有する基質の生物水素化(biohydrogenation)により製造する。生物水素化は、サッカロミセス・デルブルエキイ(*Saccharomyces delbrueckii*)、ピヒア・オウメリ(*Pichia ohmeri*)、ハンゼヌラ・アノマラ(*Hansenula anomala*)、ピヒア・スティピティス(*Pichia stipitis*)、デバリオミセス・ハンゼニ(*Debaryomyces hansenii*)、ザイモモナス・モビリス(*Zymomonas mobilis*)、ザイゴサッカロミセス・ルキシイ(*Zygosaccharomyces rouxii*)、シャウンニオミセス・オシデンタリス(*Schawnniomyces occidentalis*)、サルサイナ・ルテア(*Sarcina lutea*)およびジオトリクム・カンジダム(*Geotrichum candidum*)からなる群から選ばれた微生物を用いて行う。

【効果】 天然の香料として有用なラクトンを効率よく製造できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 デルターデカノリドおよび／またはデルタードデカノリドまたはそれらの混合物を、対応する不飽和ラクトンであるデルターデセン-2-オリドもしくはデルタードデセン-2-オリド、またはそれらの混合物を含有する基質の生物水素化により製造する方法において、生物水素化を、サッカロミセス・デルブルエキイ、ビヒア・オウメリ、ハンゼヌラ・アノマラ、ビヒア・スティピティス、デバリオミセス・ハンゼニ、ザイモナス・モビリス、ザイゴサッカロミセス・ルキシイ、シャウンニオミセス・オシデンタリス、サルサイナ・ルテアおよびジオトリクム・カンジダムからなる群から選ばれた微生物を用いて行うことを特徴とする方法。

【請求項 2】 基質がマソイア (*Massoia*) 抽出物である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 基質に等モル量のベーターシクロデキストリンを添加する請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】 請求項 1～3 のいずれかの項記載の方法で製造されたデルターデカノリドまたはデルタードデカノリド。

【請求項 5】 請求項 1～3 のいずれかの項記載の方法で製造されたデルターデカノリド、デルタードデカノリド化合物またはそれらの混合物からなる天然香料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、飽和デルターラクトン類の製造方法、特に、デルターデカノリドおよび／またはデルタードデカノリドを、対応する天然不飽和化合物の、微生物を用いた生物水素化 (biohydrogenation) により製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 合成香料よりも天然香料が消費者に好まれることから、天然資源からの抽出によっては低価格で得られない香料製品を相当量得られるような自然の方法についての研究が行われるようになってきた。

【0003】 これらの方法は、低価格で利用できる天然の物質を、天然には微量にしか存在しない所望の物質へ、酵素的に変換することからなる。

【0004】 生物変換 (bioconversion) と称されるこのような方法は、6～12個の炭素原子を有するガンマーおよびデルターラクトン類の製造に特に注目を集めた。天然脂肪酸のヒドロキシル化誘導体を微生物的にベーター酸化する方法が特に有効である。この方法では、ガンマーデカノリドおよびデルターデカノリドが、それぞれ12位および13位に水酸基を有する不飽和C₁₈脂肪酸を種々の微生物に与える発酵法により単離される。しかし、最初の前駆体であるリシノール酸は天然に豊富にあるが、2番目のコリオール酸 (coriolic acid) を得ることは難しい。

【0005】 欧州特許出願 EP-A-0,412,880 号には、リ

ノール酸、リノレン酸またはオレイン酸の水酸化物またはヒドロペルオキシドを含有する物質から、該水酸化物およびヒドロペルオキシドのベーター酸化を行うことができる微生物を用いて、飽和もしくは不飽和のガンマーもしくはデルターラクトン類を製造する方法が記載されている。

【0006】 特に、上記特許出願には、リノレン酸のリボ酸素添加 (lipoxygenation) 後にヒドロペルオキシド中間体を還元するか、あるいはこの酸もしくは誘導体の光もしくは自動酸化後に還元して得られる、(S) 体のコリオール酸を用いて、デルターデカノリドを製造することが記載されている。

【0007】 カナダ特許出願第2,025,678号には、ガンマーデカノリドおよびガンマードデカノリドを、対応する不飽和ラクトンを酵母または菌類を用いた生体触媒で還元することにより製造する別の方法が記載されている。

【0008】 特に、この特許出願には、デルターデセン-2-オリドを対応飽和生成物に変換するパン酵母および種々の菌類の能力について、すなわち、酸化される際に二重結合の還元に必要な水素を供給する補助因子を再利用するための適宜糖類の存在下で、不飽和ラクトン出発物質を単に接触させるだけで、デルターデセン-2-オリドを対応飽和生成物に変換する、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) および種々の菌類、例えば、ポリボラス・デュルス (*Polyporus durus*)、イシュノダーマ・ベンゾイナム (*Ischnoderma benzoinum*)、ブジャカンデラ・アズスタ (*Bjerkandera adusta*)、ポリア・キサント (*Poria xantha*) またはプレウロツス・オストレアツス (*Preurotus ostreatus*) の能力について開示している。

【0009】 この方法の顕著な特徴は、例えばマソイア (*Massoia*) の木 [*Cryptocaria massoia*] から抽出された天然の生成物が、基質として使用されているという事実による。

【0010】 天然抽出物には、不飽和C₁₀ラクトンの外に不飽和C₁₂同族体も存在し、この同族体は上記方法において水素化されて、対応する飽和C₁₂ラクトンを生成する。

【0011】 しかし、この方法は十分なものではない。パン酵母が使用される場合、酵母対不飽和ラクトンの比が非常に高いこと、具体的には不飽和ラクトン10mgに対して酵母を9g/リットル (乾燥重量) 使用することが述べられている。基質を連続して添加すると、同量の酵母に対して限られた量の飽和生成物しか単離されない。天然基質が高価格であることを考慮すると、このことは経済的に不利である。また、大量のバイオマスが生成物の単離を困難にすることおよび／または生成物が酵母自身によって生分解されるかもしれないことを考慮すべきである。

【0012】バイオマス／不飽和基質の比は、菌類が還元生体触媒として使用された場合にはより有利である。600 mg／リットルまでの飽和生成物濃度が記載されている。しかし、一方、培養時間は7日までとより長く、また菌糸体の増殖時間は数週間となる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、少量のバイオマス、短い培養時間および高い基質濃度での作用を可能にする微生物を選択することにより、上記特許出願に記載された方法を改良することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】この目的のために、本発明の主題は、デルターデカノリドおよび／またはデルタードデカノリドまたはそれらの混合物を、対応する不飽和ラクトンであるデルターデセン-2-オリドもしくはデルタードデセン-2-オリド、またはそれらの混合物を含有する基質の生物水素化 (biohydrogenation) により製造する方法であり、この方法は、生物水素化を、サッカロミセス・デルブルエッキ (*Saccharomyces delbrueckii*)、ピヒア・オウメリ (*Pichia ohmeri*)、ハンゼヌラ・アノマラ (*Hansenula anomala*)、ピヒア・スティピティス (*Pichia stipitis*)、デバリオミセス・ハンゼニ (*Debaryomyces hansenii*)、ザイモモナス・モビリス (*Zymomonas mobilis*)、ザイゴサッカロミセス・ルキシイ (*Zygosaccharomyces rouxii*)、シャウンニオミセス・オシデンタリス (*Schawanniomyces occidentalis*)、サルサイナ・ルテア (*Sarcina lutea*) およびジオトリクム・カンジダム (*Geotrichum candidum*) からなる群から選ばれた微生物を用いて行うことを特徴とする。特に、サッカロミセス・デルブルエッキ CBS 1146 [現在、トルラスボラ・デルブルエッキ (*Torulaspora delbrueckii*) と命名されている]、ピヒア・オウメリ CBS 5367、ハンゼラ・アノマラ (現在、ピヒア・アノマラ) CBS 110、ピヒア・スティピティス CBS 5773、デバリオミセス・ハンゼニ CBS 767、ザイモモナス・モビリス ATCC 29191、ザイゴサッカロミセス・ルキシイ CBS 732、シャウンニオミセス・オシデンタリス CBS 819、サルサイナ・ルテア DMS 348 およびジオトリクム・カンジダム CBS 233 76株が挙げられる。

【0015】上記微生物の増殖期の培養物は、純粋な状態またはマソイア (Massoia) 抽出物中の不飽和ラクトンおよびその高級同族体を還元して、1.5 g／リットルまでの基質濃度および24～48時間の接触時間で、単離生成物のモル収率が85%までの量で対応する飽和化合物を得ることができる。

【0016】典型的には、微生物は27～30℃においてMPGA固体培地 (20、5、20、15) (数字は麦芽、ペプトン、グルコースおよび寒天の各濃度を示す) で増殖する。この培養物は、MPGA液体培地で24時間かけて予備接種物を調製するのに使用され、この予備接種物50mlは、MPGA 5

0ml を含有する300 mlフラスコに10%の濃度で接種するのに使用される。24～48時間後、デルターデセン-2-オリド [マソイアラクトン (Massoia lacton)] を精製物あるいはマソイア抽出物として、あるいはより高級な同族体デルタードデセン-2-オリドとの混合物の形で、または精製したデルタードデセン-2-オリドを、1～2 g／リットルの濃度で添加する。培養液を30℃において24～48時間撹拌を続ける。

【0017】基質の添加時に、当モル量のペーターシクロデキストリンを添加してもよい。

【0018】一定時間後、培養液をpH3 にし、適宜慣用の手段、例えば好ましくは塩化メチレンや酢酸エチルのような有機溶剤での抽出により、変換した生成物を回収する。

【0019】溶剤を例えば硫酸ナトリウムを用いて乾燥し、蒸発させ、次いで残留物を減圧蒸留する。組成をGLC分析により決定し、ある場合には抽出時に添加した内標準に対する変換生成物の比を測定することにより定量分析を行うこともある。

【0020】この方法では、不飽和ラクトンの生物水素化は24時間で完了する場合もあれば、さらに24時間接触させた後に水素化が確認される場合もある。

【0021】生産されるバイオマスの量はかなり少なく、エマルジョンの問題や回収の際の生産物の損失も生じない。

【0022】

【実施例】

【0023】

【実施例1】MPGA培地で3日間増殖させたデバリオミセス・ハンゼニ CBS 767の培養物を、MPGA 50mlへ接種するのに使用し、27～30℃で24時間撹拌培養した後、MPGA 500mlへ接種する。48時間の撹拌培養後、培養液50mlを含有する300 mlフラスコ10個にマソイアラクトン50mgを添加する。培養液を撹拌しながら24時間保ち、次いで培養液を集めてpHを3にし、塩化メチレン50mlでの抽出を3回行う。乾燥した有機相を分留塔で蒸発させ、残留物を減圧蒸留する。出発物質を含まないデルターデカノリドを約90%を含有する抽出物 420 g が得られた。

【0024】培養液50mlに対し、不飽和基質をそれぞれ75および100mg用いた場合、24時間後に、不飽和／飽和の比が GLC分析で認められた。

【0025】

【実施例2】実施例1と同様の条件下で増殖させたピヒア・オウメリ CBS 5367 の培養物を、それぞれ0.75および1 g／リットルのマソイアラクトンで処理する。培養24時間後、不飽和化合物の完全な還元がみられ、生成物の回収率は75%であった。

【0026】

【実施例3】同様にして増殖させたハンゼヌラ・アノマラ CBS 110の培養物を、不飽和C₁₀ラクトンおよびより

高級なC₁₂同族体を含有するマソイアオイル〔ロバートット(Robertet)〕500mg/リットルで処理し、48時間後に、対応する不飽和化合物の存在化と同じ割合で飽和生成物であるデルターデカノリドおよびデルタードデカノリドのみを含有する混合物を得た。

【0027】

【実施例4】上記実施例と同様にして増殖させたサッカロミセス・デルブリエイ CBS 1146の培養物を、1g/リットルのマソイアラクトンで処理し、培養24時間後に、飽和生成物と不飽和生成物の約1:1混合物を生成した。さらに24時間たつと、完全な還元がみられ、70%の収率で生成物が単離された。

【0028】

【実施例5】実施例1と同様にして増殖させたサッカロミセス・デルブリエイ CBS 1146の培養物を、マソイアラクトン(1g/リットル)およびベーターシクロデキストリン(8g/リットル)で処理する。24時間後

に、二重結合の完全な飽和がみられ、最終的に82%の収率で所望の飽和生成物が単離された。

【0029】

【実施例6】2g/リットルのマソイアラクトンおよび8g/リットルのベーターシクロデキストリンを添加する以外は実施例5と同様の操作を行う。培養24時間後、飽和ラクトン対不飽和ラクトンの比が測定され、7:5であった。48時間後、不飽和化合物は完全に消失し、所望の化合物が抽出混合液の主成分として生じた。

【0030】

【発明の効果】本発明によれば、天然には少量しか存在しないため天然資源からの抽出によっては低価格で得られないラクトンを、微生物による生物変換により製造する方法において、特定の微生物を用いることにより、目的のラクトンを効率よく製造することができる。本発明で得られるラクトンは、天然香料として有用である。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 P 17/08				
C 1 2 R 1:78)				
(C 1 2 P 17/08				
C 1 2 R 1:85)				
(72) 発明者 マッシモ・バルベニ イタリア、10141トリノ、コルソ・モンテ クッコ130			(72) 発明者 ジアンナ・アレグローネ イタリア、10141トリノ、ヴィア・トファ ネ 44/エ	